

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-127294

(43)公開日 平成10年(1998)5月19日

(5)Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 K 14/39		C 0 7 K 14/39	
C 1 2 N 1/19		C 1 2 N 1/19	
9/90		9/90	
# (C 1 2 N 15/09	Z N A		
審査請求 未請求 請求項の数10 F D (全 16 頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願平9-237822	(71)出願人	000001904 サントリー株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号
(22)出願日	平成9年(1997)8月20日	(72)発明者	阪井 康能 滋賀県大津市本宮2-40-8
(31)優先権主張番号	特願平8-234287	(72)発明者	加藤 暢夫 京都府亀岡市西つツツヶ丘美山台2-3-18
(32)優先日	平8(1996)9月4日	(72)発明者	柴野 裕次 大阪府豊中市刀根山4-5-23
(33)優先権主張国	日本 (J P)	(74)代理人	弁理士 石田 敬 (外3名)

(54)【発明の名称】 メタノール酵母由来のプロテインジスルフィドイソメラーゼ遺伝子

(57)【要約】

【課題】 新規なプロテインジスルフィドイソメラーゼ及びそれをコードする遺伝子の提供。

【解決手段】 配列番号1に記載のアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列に対して1個又は複数個のアミノ酸の欠失、付加又は他のアミノ酸による置換により修飾されているアミノ酸配列を有し、且つプロテインジスルフィドイソメラーゼ活性を有するメタノール酵母由来の蛋白質、ならびにそれらをコードする遺伝子。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するプロテインジスルフィドイソメラーゼ活性を有するメタノール酵母由来の蛋白質、又は該アミノ酸配列に付して1個又は数個のアミノ酸の欠失、付加又は他のアミノ酸による置換により修飾されているアミノ酸配列を有し、且つプロテインジスルフィドイソメラーゼ活性を有する蛋白質。

【請求項2】 Cys-Gly-His-Cys（配列番号：4）からなる活性中心の保存領域とArg-Asp-Glu-Leu（配列番号：9）からなる小胞体保持シグナル配列を有し、且つプロテインジスルフィドイソメラーゼ活性を有するメタノール酵母由来の蛋白質。

【請求項3】 請求項1又は2に記載の蛋白質をコードする遺伝子。

【請求項4】 配列番号1に記載の塩基配列で表される請求項3記載の遺伝子。

【請求項5】 請求項3又は4記載の遺伝子を含んで成るベクター。

【請求項6】 請求項5に記載のベクターにより宿主を形質転換して得られる形質転換体。

【請求項7】 前記宿主がメタノール酵母である請求項6記載の形質転換体。

【請求項8】 前記メタノール酵母がキャンディグ・ボイディニ（*Candida boidinii*）である請求項7に記載の形質転換体。

【請求項9】 請求項6ないし8に記載の形質転換体を培養し、該形質転換体からプロテインジスルフィドイソメラーゼ活性を有する蛋白質を採取することを特徴とする、該蛋白質の製造方法。

【請求項10】 請求項5に記載のベクターと異種構造遺伝子を含むベクターを用いて宿主を共形質転換し、得られる形質転換体を培養し、該培養物から該異種構造遺伝子の発現生産物であるペプチド又は蛋白質を採取することを特徴とする該異種構造遺伝子によりコードされるペプチド又は蛋白質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、タンパク質中のジスルフィド結合の形成を触媒することにより、タンパク質の高次構造形成を促進する酵素であるプロテインジスルフィドイソメラーゼおよびその遺伝子に関する。とりわけ、プロテインジスルフィドイソメラーゼの中でも、異種構造遺伝子の発現生産物の効率が非常に高いタンパク質の工業的生産に好適な微生物であるメタノール酵母由来のプロテインジスルフィドイソメラーゼおよびその遺伝子に関する。

【0002】

【従来の技術】プロテインジスルフィドイソメラーゼ（PDI；Protein Disulfide Isomerase）は小胞体

（以下ERと記載する）内腔の主要タンパク質であり、還元したR.N.a.s.eを酸化的にリフォルディングする活性として最初に見いだされた（Goldberger, R.F. et al. (1963) J. Biol. Chem. 238, 628-635）。PDIは分泌タンパク質のジスルフィド結合を組み替えることにより安定な高次構造の形成を触媒している酵素であると考えられている。

【0003】異種タンパク質、とりわけジスルフィド結合を持つことの多い分泌タンパク質の場合、PDIによるジスルフィド結合の組み換えが、ペプチジルプロリシトランスイソメラーゼ（PPI；Peptidyl-Prolyl-cis-trans Isomerase）によるタンパク質のフォルディングと共に、タンパク質の分泌過程における律速段階であることが指摘されている（Gething, M.J. and Sambrook, J. (1992) Nature 355, 33-45）。また、in vitroにおいてもPDIが、R.N.a.s.eなどの単一ドメインからなるタンパク質のフォルディングを促進することが示されている（Jaenicke, R. (1993) Curr. Opin. Struct. Biol. 3, 104-102）。

【0004】一方、メタノール酵母はメタノールを唯一炭素源として生育し、菌体収率も高いことから、ホルムアルデヒドなどのアルデヒド類、エポキシイド、メチルケトン、キ酸などの合成化学工業原料の製造に用いられてきた。また、菌体そのものをタンパク質資源として利用することや、菌体成分であるアミノ酸、ビタミン等の生産に利用することも研究され、実用化されているものもある。また、最近になってメタノール酵母を宿主とした異種遺伝子の発現系が開発され、サッカロマイセス（*Saccharomyces*）酵母よりも高い生産性を有することが示されている（特開平5-344895）。

【0005】特に分泌タンパク質の場合にはその生産性は高く、例えばリゾチーム由来枯菌由来のグルコミラーゼの場合、3.4 g/Lとサッカロマイセス酵母に比較して約10倍の生産性を示した（Sakai, Y. et al. (1996) Biochim. Biophys. Acta 1308, 81-87）。なお、メタノール酵母としては、キャンディグ・ボイディニ（*Candida boidinii*）、ヒキア・バストリス（*Pichia pastoris*）、ハンセメラ・ポリモルファ（*Hansenula polymorpha*）等が知られている。

【0006】遺伝子組換え技術によって異種タンパク質の分泌生産を行う場合、タンパク質のフォルディングの速度を速めることにより、分泌効率が向上すると考えられる。このような考えを基に、ヒトPDIの遺伝子をサッカロマイセス酵母中の自遺伝子と共に共発現させることにより、ヒト血清アルブミンの分泌量を平均で60%増加させた例が開示されている（特開平6-38771）。

【0007】タンパク質の適切なフォルディングのために必要とされるジスルフィド結合の形成や交換には適切な環境が必要で、そのために真核生物細胞ではERやゴ

ルジ装置などの細胞内コンパートメントを持っており、分泌タンパク質はこのように細胞内オルガネラの中を移行しながら、適切なフォールディングや糖鎖付加を受けて、エキソサイトームスによって細胞外に分泌される。真核生物の分泌タンパク質は分子内ジスルフィド結合を持ったものが多く、ER中で起こるジスルフィド結合の形成や交換反応は、そのタンパク質の高次構造形成や分泌に必須である。

【0008】従って、ジスルフィド結合の形成や交換反応を触媒するPD Iは、ER内に局在あるいは残留することが必要で、このために小胞体保持シグナルとよばれる特有のアミノ酸配列をC末端に持っている。小胞体保持シグナルの配列としては、動物ではHis-Asp-Glu-Leu（配列番号：2）、サッカロマイセス酵母ではHis-Asp-Glu-Leu（配列番号：3）が知られている。上記記載のヒトPD I遺伝子をサッカロマイセス酵母で発現させた場合、ヒトPD IのER保持シグナルがサッカロマイセス酵母で十分機能せず、PD IのER内局在化が十分果たせなかったと考えられる。このためにPD I遺伝子を高発現させても、それに見合ったER内のPD I活性の向上が起らず、発現させた分泌タンパク質の分泌量の増大が60%という値に留まったと考えられる。

【0009】メタノール酵母で発現させたPD Iが十分機能を発揮するためには、メタノール酵母由来のPD Iを利用するのが望ましい。また、メタノール酵母が前述の如くタンパク質分泌能が高いのは、タンパク質分泌過程の律速段階であるPD Iによるジスルフィド結合の組み換えが効率よく行われているためと考えられ、メタノール酵母由来のPD Iは他起源のPD Iに比較して比活性が高いため、ER内の活性が高いと考えられる。しかしながらメタノール酵母のPD Iおよびその遺伝子については未だ知られていない。従ってそれを利用したメタノール酵母分泌発現系における生産性の向上についても、何ら検討されていない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、メタノール酵母が持つPD I遺伝子をクローニングし、その塩基配列を明らかにして、メタノール酵母のPD Iの特徴を解明すべく鋭意研究を行った。すなわち、本発明の目的は、メタノール酵母における異種タンパク質の分泌生産をより効率的に行うために、メタノール酵母由来のPD I遺伝子を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成するために、PD Iの活性部位にある保存領域のアミノ酸配列を基に合成したオリゴヌクレオチドをプライマーとして、PCRにより増幅DNA断片を得た。この増幅DNA断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーション法によって、メタノール酵母キャンディグ・ボイディニ（*Candida boidinii*）のPD I遺伝子をク

ローニングし、当該遺伝子の塩基配列および当該PD Iのアミノ酸配列を明らかにした。さらに、当該PD I遺伝子で形質転換したメタノール酵母中で、糸状菌由来のペルオキシゲナーゼ遺伝子を共発現させることにより当該ペルオキシゲナーゼの分泌発現量を約10倍増加させ、本発明を完成した。

【0012】従って、本発明は、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するプロテインジスルフィドイソメラーゼ活性を有するメタノール酵母由来の蛋白質、又は該アミノ酸配列に対して1個又は複数個のアミノ酸の欠失、付加又は他のアミノ酸による置換により修飾されているアミノ酸配列を有し、且つプロテインジスルフィドイソメラーゼ活性を有するメタノール酵母由来の蛋白質を提供する。本発明はさらに、Cys-Gly-His-Cys（配列番号：4）を含む活性中心の保存領域とArg-Asp-Glu-Leu（配列番号：9）からなる小胞体保持シグナル配列を有し、且つプロテインジスルフィドイソメラーゼ活性を有するメタノール酵母由来の蛋白質を提供する。

【0013】本発明はまた、PD Iをコードする遺伝子、誘導遺伝子を含んで成るベクター、該ベクターにより形質転換された宿主、および該形質転換宿主を用いてPD Iを製造する方法、並びに前記ベクターと目的タンパク質をコードする遺伝子を含むベクターとで共形質転換された宿主、および該形質転換宿主酵母において目的分泌タンパク質遺伝子を共発現させることにより目的タンパク質を重量分泌する方法を提供する。

【0014】

【発明の実施の形態】以下に本発明を詳細に説明する。まず、ジスルフィド結合交換反応の活性中心として各種起源のPD Iで保存されている配列、Cys-His-Gly-His-Cysをサッカロマイセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）のPD Iアミノ酸配列中に2か所見いだした。この配列を含む*S. cerevisiae*のPD Iアミノ酸配列をもとに、メタノール酵母のコード使用頻度を参考にして各種のPCR用プライマーを設計した。これらのプライマーを用いてメタノール酵母のゲノムDNAを鋳型にしてPCR反応を行い、得られたPCR反応生成物の塩基配列から推定されるアミノ酸配列が、*S. cerevisiae*のPD Iアミノ酸配列と類似性を持っていることを確認した。

【0015】メタノール酵母のゲノムDNAを各種制限酵素で完全分解し、アガロース電気泳動により分画する。上記記載のPCR産物をプローブにしてザサンハイブリダイゼーションを行い、PD I遺伝子の全領域を含み、最小のDNA断片を生じる制限酵素を知る。その制限酵素で完全分解したメタノール酵母のゲノムDNAを用いてゲムライブラリーを作成し、上記記載のPCR産物をプローブにしたコロニーハイブリダイゼーションによってPD I遺伝子を持ったクローンを選択する。

【0016】選択したクローンからプラスミドを抽出

し、サザンハイブリダイゼーション解析によって上記記載のPCR産物の配列を含んでいることを確認する。さらに、このプラスミドの挿入断片の制限酵素地図を作成し、これを基にサブクローニングを行いPD I遺伝子を含む最小のDNA断片を取得する。取得したDNA断片の塩基配列を決定し、メタノール酵母由来PD Iのアミノ酸配列を解析する。

【0017】このようにして得られたメタノール酵母由来PD I遺伝子をメタノール酵母で高発現させ、PD Iを製造することができる。PD I遺伝子の発現ベクターとしては公知のものが使用できるか、メタノール酵母キヤンディグ・ボイディニの発現ベクターとしては特開平ラ-344895に記載のpNite1やpRexが利用できる。メタノール酵母の形質転換法および外来遺伝子が染色体DNAに組み込まれた形質転換体の取得法は、公知の方法(Sakai, Y. et al., (1991) J. Bacteriol., 173, 7458 ~ 7463)が利用できる。また、メタノール酵母由来PD I遺伝子を、目的分泌タンパク質遺伝子と共にメタノール酵母細胞内で共発現させることにより、目的分泌タンパク質の分泌量を増大させることができる。

【0018】メタノール酵母*C. boidinii*由来のPD Iは、Arg-Asp-Glu-Leu (配列番号: 9) というサッカロマイセス酵母のHis-Asp-Glu-Leu (配列番号: 3) とは異なる小胞体保持シグナルを持っているが、自分自身のものである以上、*C. boidinii*の細胞内に認識されて、PD IがERに保持されてその機能を十分発揮することは間違いない。PD Iの発現に用いる発現ベクターは、上記記載のpNite1やpRexの発現用要求性マーカーを、目的タンパク質の発現ベクターに用いたものとは異なる遺伝子に変えたものを用いることができる。また、宿主メタノール酵母に2つの発現ベクターのマーカーに対応した栄養要求性を付与することにより、上記記載の方法で形質転換が可能である。また、メタノール酵母へ栄養要求性を付加する方法については、公知の方法(Sakai, Y. et al., (1991) J. Bacteriol., 173, 7458 ~ 7463)が利用できる。

【0019】

【実施例】以下に実施例を掲げて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1、キャンディグ・ボイディニ (*Candida boidinii*) S2株 (Tani, Y. et al., (1985) Agric. Biol. Chem., 49, 2699 ~ 2706) より、PD I遺伝子の取得、およびその塩基配列の決定を行った。なお、当該株は*Candida boidinii* SM1958と命名され、工業技術院微生物工業技術研究所に受託番号: 飯工研家第376号 (FEIM BP-3766) として1992年2月25日に寄託されている。

【0020】(1) PCRによる増幅
ジスルフィド結合交換反応の活性中心として各種起源のPD Iで保存されている配列、Cys-Gly-His-Cys (配列

番号: 4) に関する*S. cerevisiae* のPD I中のアミノ酸配列として以下の2つの配列に注目した。

Pro-Trp-Cys-Gly-His-Cys-Lys (配列番号: 5) (サッカロマイセス酵母のPD Iにおけるアミノ酸配列番号59 ~ 65番目のアミノ酸)

Tyr-Ala-Pro-Trp-Cys-Gly-His (配列番号: 6) (サッカロマイセス酵母のPD Iにおけるアミノ酸配列番号402 ~ 408番目のアミノ酸)

C. boidinii コドン使用頻度を参考にして、このアミノ酸配列に対応する以下のような塩基配列のオリゴヌクレオチドを合成した。

【0021】すなわち、センスプライマーとして、
5'-CGGGAATC CCT (A) TGG TGT (C) GGT (A) CAT (C) TGT (C) AAT-3' (配列番号: 7)

アンチセンスプライマーとして、
5'-CGGGATCC TGA (T) CCA CCA A (T) GG A (G/T) GC A (G) T-3' (配列番号: 8)

を合成した。これらのオリゴヌクレオチドの5'末端にはEcoRI およびBamHI の認識する配列がそれぞれあり、この2つのプライマーで増幅されたDNA断片の5'末端にはEcoRI サイトが、3'末端にはBamHI サイトが形成されるようになっている。

【0022】*C. boidinii* のゲノムDNAを鋳型にして、上記記載の2つのオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCR反応を行ったところ、約1 kbの増幅DNA断片が認められた。この増幅断片を回収し、制限酵素EcoRI 消化によって得られた約250 bpのDNA断片を、EcoRI 消化したpBluescript II SK+に挿入した。挿入断片の塩基配列を解析したところ、*S. cerevisiae* PD Iのアミノ酸配列と高い相同性を持つアミノ酸配列をコードする塩基配列が認められたので、このDNA断片を*C. boidinii* のPD I遺伝子の一部であると断定した。

【0023】(2) ゲノムDNAのサザンハイブリダイゼーション解析

キャンディグ・ボイディニS2株の菌体よりゲノムDNAを単離した。DNAの単離法としては、例えばクリエールAの方法 (Cryer, D.R. et al., (1975) Meth. Cell Biol., 12, 39~44) が挙げられる。キャンディグ・ボイディニS2株のゲノムDNAを各種制限酵素で切断し、0.7%アガロースゲル電気泳動で分離した。分離したDNAをゲルからナイロンメンブレン (アマシャム社製) に転移、固定した。上記記載のPD I遺伝子を含む250 bp DNA断片をランダムプライマー・キット (アマシャム社製) を用いて、32 Pで標識した

【0024】標識したDNA断片を、5' xSSC-1xSSB-tx0.5% enhancer 溶液に加えハイブリダイゼーション溶液を作成した。DNAを固定したナイロンメンブレンにこのハイブリダイゼーション溶液を加え、プラスチクバッグに封入した。封入したナイロンメンブレンを65℃、16

時間インキュベートした後、ナイロンメンブレンをブラスチックバッグから取り出して、 $2\times\text{SSC}-0.1\%\text{SDS}$ 溶液にて室温で洗った。次にナイロンメンブレンを $0.3\times\text{SSC}-0.1\%\text{SDS}$ 溶液中で65℃、30分間インキュベートした後、溶液を新しいものに変え、65℃、30分間のインキュベーションを繰り返した。メンブレンを $2\times\text{SSC}$ で洗った後、風乾してオートラジオグラフィを行った。上記記載の250bpのプローブとハイブリタイズする最小のDNA断片として、図2に示すように約6、2kbのXbaI断片が見いだされた。

【0025】(3) コロニーハイブリダイゼーションによるPDI遺伝子のクローニング
キャンディグ・ボイディニS2株のゲノムDNAを制限酵素XbaIで完全消化し、0.7%アガロースゲル電気泳動で分離した。6、2kb付近のアガロースを切り出し、DNAセトル(第一化学社製)を用いてDNA断片を回収した。XbaIで消化したpBluescript II SK+にこの回収したDNAを挿入し、大腸菌JM109株を形質転換してキャンディグ・ボイディニS2株のゲノムライブラリーを作成した。

【0026】このライブラリーを、上記250bpのDNA断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーション法によってスクリーニングし、陽性のクローンを得た。ハイブリダイゼーションの条件は、上記のサザンハイブリダイゼーションの条件と全く同一である。陽性のクローンからプラスミドを回収し、挿入DNA断片の制限酵素地図を作成した。作成した制限酵素地図を図1に示す。この制限酵素地図をもとにサブクローニングを行い、PDI遺伝子を含むDNA断片をXbaIからSalIまでの約2kb(図1中で左側)に限定した。

【0027】(4) 塩基配列の決定
上記記載のXbaIからSalIまでの約2kbのDNA断片の塩基配列を決定した。このDNA断片をファージM13に両方向にクローニングし、2本鎖DNA(RF)を各々調製した。これらの二本鎖DNAを大腸菌エキソヌクレアーゼIIIと反応させ、一方に欠失が導入された二本鎖DNAを調製した。エキソヌクレアーゼIIIを利用して一方に欠失が導入された二本鎖DNAの作成法に関しては、「遺伝化学実験講座、第1巻、遺伝子研究法II」の289-305頁に詳しく記載されている。

【0028】前記の方法により得られた一方に欠失が挿入された各二本鎖DNAを大腸菌JM109株に形質転換して、一方に欠失が挿入されたファージクローンを作成した。各ファージクローンから二本鎖DNAを調製して、制限酵素による切断パターンから欠失の程度を調べ、適当なクローンから二本鎖ファージDNAを調製した。これら一本鎖ファージDNAを鋳型として、ジデオキシ法(Sanger, F., et al., (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463)によって塩基配列を決定した。各クローンの塩基配列をつなぎ合わせることによ

り、図1中XbaIサイトからSalIサイトの手前までの2,0kbの塩基配列を決定した。

【0029】配列番号1に塩基配列と、塩基配列から導かれるPDIのアミノ酸配列を示した。C. boidiniiのPDIは、配列番号1の塩基配列番号367から1959番目までの塩基配列によってコードされた531アミノ酸からなることがわかり、PDI I遺伝子と名付けた。PDI Iのアミノ酸配列は、S. cerevisiae由来のPDIと45%、ヒトPDIと22%の同一性を示した。類似のアミノ酸を含めると、S. cerevisiaeのPDIと64%、ヒトPDIと49%の類似性を示した。

【0030】PDIのジスルフィド結合交換反応の活性中心として各種起源のPDIで保存されている配列、即ちCys-Gly-His-Cys(配列番号:4)が配列番号1の61から64番目のアミノ酸配列、および408から411番目のアミノ酸配列の2カ所に見いだされた。また、C末端に存在する小胞体保持シグナル配列は、Arg-Asp-Glu-Leu(配列番号:9)であり、S. cerevisiaeのPDIのHis-Asp-Glu-Leu(配列番号:3)や哺乳類のPDIに広く認められるLys-Asp-Glu-Leu(配列番号:2)とも異なる配列であった。

【0031】なお、プロテインジスルフィドイソメラーゼ活性の測定は、還元・変性・再酸化による方法で作成したスクランブルドリボヌクレアーゼA(RNase A)の再構成への促進効果を見ることにより行うことができる。リボヌクレアーゼAの再構成の程度は、その酵素活性の回復の程度を指標として定量化する(特開平6-38771)。上記方法によりPDI活性を測定したところ、上記DNA断片を含有するメタノール酵母形質転換体が、表1に示すように対照とした形質転換していないメタノール酵母よりも高いプロテインジスルフィドイソメラーゼ活性を有することが確認された。

【0032】実施例2. 菌株の目的タンパク質の分泌メタノール酵母C. boidinii由来のPDI I遺伝子と、糸状菌Arthronyces raamosus由来のペルオキシダーゼ(ARP)遺伝子とを共発現することにより、ARPの分泌量が増加することを確認した。なお、発現ベクターとして用いたpNteIおよびARP発現ベクターpNteI-ARPについては特開平5-34895に開示されている。

【0033】pNteIの発現要求性マーカー(AR3)を、C. boidinii由来のLEU2遺伝子と交換することにより、pNteIとは異なる発現要求性マーカーを持った発現ベクターを作ることが出来る。また、宿主メタノール酵母にこの2つの発現ベクターのマーカーに対応した発現要求性を付与することにより、上記記載の2種の発現ベクターによる形質転換が可能である。メタノール酵母ハネ発現要求性を付加する方法については、公知の方法(Sakai, Y. et al. (1991) J. Bacteriol., 173, 7458-7463)が利用できる。

【0034】(1) 発現ベクターの構築

ARP 遺伝子を含む1.1 kbのEcoRI DNA 断片をプラスミド pNotI-ARP から切り出し、pNotIのNot I サイトに挿入して、図3(a)に示したプラスミドpNP03 を作成した。

【0034】PD1遺伝子の発現のために、栄養要求性マーカーとしてLEU2遺伝子をもち、相同組み換え部位として*C. bovidini*のリボソームDNA(rDNA)をもつ発現ベクターを例4に示した手順で作成した。まず、pNotIをEcoRIとBlnIで切断して、*C. bovidini*のアルコールオキシダーゼ遺伝子(ARD1)のプロモーター・ターミネーターを含む2.0 kbのDNA 断片を切り出し、pUC19のEcoRI-BlnI III サイトに挿入して、プラスミドpNotI46を作成した。

【0035】*C. bovidini* 由来のrDNAを含むDNA 断片をPCRにより得、pNotI46のBlnI IIIサイトに挿入して、pNotI46Rを作成した。*C. bovidini* のLEU2遺伝子を含むプラスミドpGLR321 (Sakai, Y. and Tani, Y. (1992) J. Bacteriol., 174, 5988-5993) を、EcoRIで消化して3.2 kb のLEU2遺伝子を含むDNA 断片を切り出して平滑末端にした。この平滑末端化した3.2 kb のDNA断片を、NdeI消化後および平滑末端化したpNotI46Rに挿入して、pNL1を作成した。上記発現ベクターに組み込むために、PD1遺伝子の両端にNotIサイトをPCR 法によって作成した。

【0036】センスプライマーとして、5'-ATAGAAATGCGGCGGAAATGAAGTTAACTTAATTTCAAA-3' (配列番号: 10)

アンチセンスプライマーとして、

5'-ATAGAAATGCGGCGGCTTATATTCATCAGAACATCA-3' (配列番号: 11)

を合成した。この2つのオリゴヌクレオチドの5'末端側にはNotIが認識する配列があり、これらのプライマーを用いて増幅されたDNA 断片には、PD1遺伝子の開始コドンの直前と終止コドンの直後にNotIサイトが形成されるようになっている。*C. bovidini* のゲノムDNAを鋳型にして、上記記載の2つのプライマーを用いてPCR 反応を行い、増幅された1.6 kbのDNA 断片をNotI消化後、プラスミドpGLR321 SR+ のNotIサイトに挿入して、pSKPD を作成した。pSKPD をNotI消化して得られる1.6 kbのDNA 断片を、上記記載のpNL1のNotIサイトに挿入して、図3(b)に示すpNP02 を作成した。

【0037】(2) 形質転換酵母株の作成
上記(1)に記載の発現ベクター2種を用いて、メタノール酵母*C. bovidini*の形質転換体を作成した。宿主に用いた菌株は、特開平5-344895において開示されている*C. bovidini* K62 (ura3) 株の、LEU2遺伝子を破壊した*C. bovidini* BUL (ura3, leu2) である。*C. bovidini* のLEU2遺伝子については、Sakai によって開示されている (Sakai, Y. and Tani, Y. (1992) J. Bacteriol., 174, 5988-5993)。*C. bovidini* の形質転換法の方法については、特開平5-344895において開示されている。

【0038】まず、ARP 遺伝子の形質転換体を作成した。上記記載のARP 発現ベクターpNP03 をBam HI消化して直鎖状にした後、*C. bovidini* BUL (ura3, leu2) 株を形質転換して、ura3+ で形質転換体を選択した。選抜された形質転換体の一つであるBPP17 株においては、図5(A)、B)に示すように、宿主酵母BUL 株の染色体DNA上のura3 部位と発現ベクターpNP03 中のURA3 部位との相同組み換えにより、ARP 遺伝子を含むpNP03 の全領域がura3 部位に組み込まれている。このことは、図5(C)に示すように、宿主BUL 株および形質転換体BPP17 株のゲノムDNAをBam HI で消化した後、URA3 遺伝子の全領域を含む3.3 kbのBamHI-SalI DNA断片をプローブとして行ったサザンハイブリダイゼーションにおいて、BUL 株には5.5 kbの、BPP17 株には4.4 kb のハイブリダイズするバンドが認められることから確認された。

【0039】次に、上記記載のARP 遺伝子で形質転換した*C. bovidini* BPP17 (1eu2) 株を宿主として、PD1 遺伝子の形質転換体を作成した。PD1 発現ベクターpNP04 をApaI消化により直鎖分子にした後、BPP17 (1eu2) 株を形質転換して、Leu+で選択することによりBPP1 株を取得した。BPP1 株においては、図6(A)、B)に示すように、宿主酵母BPP17 株の染色体DNA 上のrDNA部位と発現ベクターpNP03中のrDNA部位との相同組み換えにより、PD11遺伝子を含むpNP04 の全領域がrDNA部位に組み込まれている。

【0040】図6(C)に示すように、BUL 株、宿主BPP17 株および形質転換体BPP17株のゲノムDNA をBlnIで消化した後、pSKPD をNotI消化して得られるPD11遺伝子を含む1.6 kbのDNA 断片をプローブとして行ったサザンハイブリダイゼーションにおいて、BUL 株およびBPP17 株からは12.6 kb の内在性のPD11遺伝子を含む領域に由来するバンドが、BPP1株からは上記12.6 kb のバンド以外に発現ベクターpNP04 由来する6.1 kbのバンドが認められることから、染色体DNA へのPD11遺伝子の組み込みが確認された。

【0041】(3) 形質転換体の解析
ARP 遺伝子で形質転換したBPP17 株、ARP 遺伝子とPD1 遺伝子の両方で形質転換したBPP1株、および宿主として用いたBUL 株から mRNA を抽出し、ノーザンハイブリダイゼーションによってPD11遺伝子の発現量を調べた。メタノールを唯一炭素源とするYM培地 (Sakai, Y., et al., (1981) J. Gen. Microbiol., 123, 365-366) で、30°C、48時間培養した上記3菌株の菌体から、150G EN (日本ジーン社製) によって全RNA を抽出し、BIOMAG mRNA 精製キット (パーセプティブ社 (PerSeptive Diagnostics) 製) によって精製した。

【0042】精製したmRNAを1.1 %アガロースゲル (20 mM MOPS緩衝液、1 mM EDTA、2.2Mホルムアミドを含む) で電気泳動後、サイロニン膜にプロットングした。

実施例1に記載のサザンハイブリダイゼーションと全く同一の条件でハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションに用いたプローブは、上記記載のpS KPD 由来の1.6 kbのNotI-BlnA断片を用いた。図7に示すように、PD11遺伝子の強い発現が9PD1遺伝子で形質転換したBP01株に認められ、内在性のPD11遺伝子によると思われる弱い発現がBUL株およびBP017株に認められた。

【0044】上記3種の菌株をメタノールを唯一炭素源とするYM培地で30℃、48時間培養した後、菌体中のPD1活性を測定した。集菌した菌体を50 mM リン酸カリ緩衝液 (pH 7.5) に懸濁し、2 mlのエピペンドルフチューブに移して、等量のジルコニウム・ピーズ (直径 0.5 mm) を加えた。チューブをビーズ・ビーター (モデル310BX、バイオスペース社 (Biospec Products)) で30秒激しく撹拌後、30秒氷浴するという操作を6回繰り返した。菌体破砕液を4℃、16,000 x g、5分間遠心し、上清の酵素活性を測定した。

【0045】PDI活性の測定はヒルソンの方法 (Hilson, P.A. et al. (1984) Methods Enzymol., 107, 281-

294)に従った。すなわち、最終1 mlの反応液中に、50 mMのリン酸カリ緩衝液 (pH 7.5)、500 μ g のスクランブルDNase、0.01 mM のディチオスライトールを含む。反応液を15分間インキュベートした後、10 μ lを抜き取り3 mlの0.25 mg/mlの酵母RNAを含む10M 緩衝液 (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、25 mM KCl、5 mM MgCl₂)を加え、30℃で2分間、260 nmでの吸収を紫外光キュベット中で測定することにより、DNase活性を測定した。1ユニットのPDI活性を、1分間に1ユニットのRNAase再活性化を触媒する酵素活性とした。ここで、1ユニットのDNase活性は、1分間に260 nmの吸収を1増大させる酵素量と定義した。

【0046】表1に示すように、菌体内のPDI活性は、PDI遺伝子で形質転換したBP01株において、ARP遺伝子のみで形質転換したBP017株や宿主に用いたBUL株よりも、9倍以上高かった。

【0047】

【表1】

酵素 \ 菌株	BUL	BP017	BP01
PDI	<0.1*	<0.1*	0.896

※ BULとBP017は測定限界以下

【0048】(3) ARPの分泌発現

ARP遺伝子で形質転換したBP017株、ARP遺伝子とPD11遺伝子の両方で形質転換したBP01株、および宿主として用いたBUL株を、メタノールを唯一炭素源とするYM培地で培養し、培養液中のARP活性を比較した。図8に示したように、ARP遺伝子とPD11遺伝子を共発現させたBP01株において、培養液中のARP活性は培養84時間目に最高値0.024 U/mlに達した。ARP遺伝子だけで発現させたBP017株では、培養液中のARP活性は培養48時間目に最高値0.002 U/mlに達したが、宿主に用いたBUL株の培養液中にはARP活性は全く検出されなかった。この結果から、PD11遺伝子とARP遺伝子を共発現させることにより、ARPの分泌発現量が約10倍増大したことがわかった。

【0049】

【発明の効果】本発明により、メタノール酵母のPDI遺伝子が取得され、本遺伝子をメタノール酵母で大量発現させてPDI酵素を取得することが可能になった。ま

た、本遺伝子を目的分泌タンパク質遺伝子とメタノール酵母内で共発現させることにより、目的タンパク質の分泌効率、すなわち目的タンパク質の生産量を飛躍的に向上させることが可能になった。

【0050】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：2030

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ゲノムDNA

ハイボセディカル配列：No

アンチセンス：No

起源

生物名：Candida boidinii

株名：S2

配列

```

AGAGGCGCTT CCACTCACTC ATTAATCAFC CAGTAATCTC TCCAGGGTTG TGAACAATTT 60
CACTCACTTG CTTGCTTTA CCACTCACTCA ATGGTTTCA TTACTTCTTG TATCAATCCA 120
CAATTTCATC ACTTTTTCAT ATCTAGTAAT AATGTCTA AGCAAGATGA ATCTTCAGC 180
AGATTCGCTC TTTCTTGATT CAATGATCTT TTAGTAGAC AGATCACTGA CAGTAATAA 240
CTTACATAGA TATATATATA TATATGATGA ATTACTTIT GTTCATTACT CAATGATTC 300
CATTTAATAC ATTACATAGA TAATATATGA CTAAATAT ATTACATAT ACACATACCA 360

```

TTTAAA	ATG	AGG	TTG	ACT	AAT	TTC	AAA	GTT	ATT	GCC	ACA	ATT	CTT	GCT	408
	Met	Lys	Leu	Thr	Asn	Phe	Lys	Val	Ile	Ala	Thr	Ile	Leu	Ala	
	1				5				10						
TGT	TTA	ACA	GTT	GTT	AGA	GCT	GAT	GAT	GCT	GAT	GCC	ATT	GCA	TCT	456
Cys	Leu	Thr	Val	Val	Arg	Ala	Asp	Asp	Gly	Gly	Ala	Ile	Ala	Ser	Pro
	15			20					25				30		
GAT	TCC	GCT	GTT	GTT	AAA	TTC	ACT	GCT	GAT	TCA	TTC	GAA	TCA	TTC	504
Asp	Ser	Ala	Val	Val	Lys	Leu	Thr	Ala	Asp	Ser	Phe	Glu	Ser	Phe	Met
				35				40				45			
AAA	GAA	AAT	CCA	TTA	GTG	TTC	GCT	GAA	TTT	TTT	GCT	CCT	TGG	TCT	552
Lys	Glu	Asn	Pro	Leu	Val	Leu	Ala	Glu	Phe	Phe	Ala	Pro	Trp	Cys	Gly
			50				55				60				
CAT	TGT	AAA	AGA	TTG	GCT	GCT	GAA	TTT	CAA	GTT	GCT	GCT	GAT	AAA	600
His	Cys	Lys	Arg	Leu	Gly	Pro	Glu	Phe	Glu	Val	Ala	Ala	Asp	Lys	Leu
	65					70				75					
GTT	GAA	AAA	GAT	ATT	AGA	TTC	GCT	CAA	ATT	GAT	TGT	ACC	GAA	GAA	648
Val	Glu	Lys	Asp	Ile	Arg	Leu	Ala	Glu	Ile	Asp	Cys	Thr	Glu	Glu	Lys
	80					85				90					
GAT	TTA	TGT	TCT	TCT	TAT	GGT	ATT	AAA	GGT	TAC	CCA	ACT	TTA	AAA	696
Asp	Leu	Cys	Ser	Ser	Tyr	Gly	Ile	Lys	Gly	Tyr	Pro	Thr	Leu	Lys	Val
	95			100					105						
TTT	AGA	GGT	TAC	GAA	AAT	GAA	CCY	TCT	GAT	TAT	GCT	GGT	CAA	AGA	744
Phe	Arg	Gly	Tyr	Glu	Asn	Glu	Pro	Ser	Asp	Tyr	Ala	Gly	Gln	Arg	Thr
			115					120			125				
TCA	GAT	TCA	ATC	ATT	TCT	TAT	ATG	GTT	AAA	CAA	TCA	ACC	CCA	CTC	792
Ser	Asp	Ser	Ile	Ile	Ser	Tyr	Met	Val	Lys	Gln	Ser	Thr	Pro	Pro	Val
	130					135					140				
TCC	ATC	GTT	GAT	GAT	CTC	TCA	GAT	ATT	GAA	GAT	ACA	ATT	AAA	GAA	840
Ser	Ile	Val	Asp	Asp	Leu	Ser	Asp	Ile	Glu	Asp	Thr	Ile	Lys	Glu	Ser
	145					150				155					
AAT	GAT	CCT	GTC	TTT	ATT	CAA	GTC	TTC	CCA	AAA	GGT	TCT	AAA	TCT	888
Asn	Asp	Pro	Val	Phe	Ile	Gln	Val	Leu	Pro	Lys	Gly	Ser	Lys	Ser	Val
	160			165						170					
GAA	GCC	GGT	AAC	TCA	ACT	TTC	TTT	GAA	ATC	GCT	AAT	GGT	TTA	AGA	936
Glu	Ala	Gly	Asn	Ser	Thr	Phe	Phe	Glu	Ile	Ala	Asn	Gly	Leu	Arg	Asp
	175			180					185			190			
AAC	TAC	TCT	TTT	ATT	TCA	ACA	ACG	ACT	GAA	TTC	TCT	TCA	AAA	TAC	984
Asn	Tyr	Ser	Phe	Ile	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Glu	Phe	Ser	Ser	Lys	Tyr
			195				200				205				
TTG	AAA	GGT	ATT	AAA	AAA	TCA	GAT	ACT	CCA	TCT	TAT	ATT	CTC	TTT	1032
Leu	Lys	Gly	Ile	Lys	Lys	Ser	Asp	Thr	Pro	Ser	Tyr	Ile	Leu	Phe	Arg
	210					215					220				
CCA	AAT	GAA	GAA	TTG	TCT	GAT	GCT	TCA	ATC	TAT	AAA	TTT	GAT	GAA	1080
Pro	Asn	Glu	Glu	Leu	Ser	Asp	Ala	TTC	Ala	Ile	Thr	Lys	Phe	Asp	Glu
	225			230			235				240				
GAT	GAT	ACT	CAT	TTA	ACT	GAA	TTT	CAA	GTT	GAA	TCA	AAA	UUT	TTA	1128
Asp	Asp	Tyr	His	Leu	Ile	Glu	Phe	Leu	Asn	Val	Glu	Ser	Lys	Pro	Leu
	240					245			250						
TTT	GGT	GAA	ATG	GAT	GGT	TCT	TCT	TTT	CAA	TCT	TAT	ATG	GAA	ATG	1176
Phe	Gly	Glu	Met	Asp	Gly	Ser	Ser	Phe	Gln	Ser	Tyr	Met	Glu	Met	Lys

255	260	265	270	
TTA CCA GTT GCT TAT TAT TTC TAT AAT GAA ATC TCT GAA AAA GAT GCC				1224
Leu Pro Val Ala Tyr Tyr Phe Tyr Asn Glu Ile Ser Glu Lys Asp Ala				
	275	280	285	
GTC TCT GAT GCC ATC AGT AAA TTA GCT AAA ACT CAT AGA GGT AAA GTT				1272
Val Ser Asp Ala Ile Ser Lys Leu Ala Lys Thr His Arg Gly Lys Val				
	290	295	300	
AAT TTC GTT GGT TTA GAC GCT TCT AAA TAT GGT TTA CAC GCT AAG AAT				1320
Asn Phe Val Gly Leu Asp Ala Ser Lys Tyr Gly Leu His Ala Lys Asn				
	305	310	315	
ATT AAC ATG AAG GAA GAA TTC CCT CTT TTC GCT ATT CAC GAT TTA GCA				1368
Ile Asn Met Lys Glu Glu Phe Pro Leu Phe Ala Ile His Asp Leu Ala				
	320	325	330	
ACT GAA TTA AAA TAC GGT ATC TCC CAA GAT AAA CCA TTA GAT AAT AAA				1416
Thr Glu Leu Lys Tyr Gly Ile Ser Gln Asp Lys Pro Leu Asp Asn Lys				
	335	340	345	350
TTA ATT CCA AAA TTC GTT GAA GAT TTC GTT GCT GGT AAA TTA GAA GCA				1464
Leu Ile Pro Lys Phe Val Glu Asp Phe Val Ala Gly Lys Leu Glu Ala				
	355	360	365	
ATC ATT AAA TCA GAA CCA ATC CCA GAA ACT CAA GAT TCT CCA GTT TAC				1512
Ile Ile Lys Ser Glu Pro Ile Pro Glu Thr Gln Asp Ser Pro Val Tyr				
	370	375	380	
CAT TTA GTC GGT AAA GAA CAT GAT AAA ATT ATT ACC TCT GAT AAA GAT				1560
His Leu Val Gly Lys Glu His Asp Lys Ile Ile Thr Ser Asp Lys Asp				
	385	390	395	
GTC TTA GTT AAA TAT TAC GCT CCA TGG TGT GGT CAC TGT AAA AAA TTA				1608
Val Leu Val Lys Tyr Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His Cys Lys Lys Leu				
	400	405	410	
GCT CCA GTC TTT GAA GAA TTA GCT GCT GTT TAT GAA TCA GTT GCT CCA				1656
Ala Pro Val Phe Glu Glu Leu Ala Ala Val Tyr Glu Ser Val Ala Pro				
	415	420	425	430
GGT AAA GTC TTA TTA GCT GAT TTA GAT CAT ACT GAA AAT GAT GTC ACC				1704
Gly Lys Val Leu Leu Ala Asp Leu Asp His Thr Glu Asn Asp Val Thr				
	435	440	445	
GGT GTT CAC ATT GAA GGT TAC CCA ACT ATC GTC TTA TAC CCA GCC GAT				1752
Gly Val His Ile Glu Gly Tyr Pro Thr Ile Val Leu Tyr Pro Ala Asp				
	450	455	460	
GGT TCA GAA CCA GTT GTT TAC GAA GGT AAC AGA TCT TTT GAA TCT TTC				1800
Gly Ser Glu Pro Val Val Tyr Glu Gly Asn Arg Ser Phe Glu Ser Phe				
	465	470	475	
TCC GAT TTC ATT AAA GAA AAA GGT TCA TCA GGT GTT GAT GCT AAT GCA				1848
Ser Asp Phe Ile Lys Glu Lys Gly Ser Ser Gly Val Asp Ala Asn Ala				
	480	485	490	
TTA AAA GAA CCT TAC CCA GAA GAA GGT ACT GAA GGT GCT CCA GTT GAT				1896
Leu Lys Glu Pro Tyr Pro Glu Glu Gly Thr Glu Gly Ala Pro Val Asp				
	495	500	505	510
CCA GAA TCA GTT GGT GAT GCT GAA AAA GAA GAT GAT TCT GCT GCT GAT				1944
Pro Glu Ser Val Gly Asp Ala Glu Lys Glu Asp Asp Ser Ala Ala Asp				
	515	520	525	
GTT GGT GAT GAA TTA TAAACAGTA GAATTATTA TAAATGATT AAATAGTCTT				1992

Val Arg Asp Glu Leu 530 531 CTAAAAATTA AATTAAAAAT AATAAAAAAA A	2030
【0051】配列番号: 2 配列の長さ: 4 配列の型: アミノ酸 トポロジー: 直鎖状 配列の種類: ペプチド 配列 Lys Asp Glu Leu	配列の長さ: 7 配列の型: アミノ酸 トポロジー: 直鎖状 配列の種類: ペプチド 配列 Pro Trp Cys Gly His Cys Lys 5
【0052】配列番号: 3 配列の長さ: 4 配列の型: アミノ酸 トポロジー: 直鎖状 配列の種類: ペプチド 配列 His Asp Glu Leu	【0055】配列番号: 6 配列の長さ: 7 配列の型: アミノ酸 トポロジー: 直鎖状 配列の種類: ペプチド 配列 Tyr Ala Pro Trp Cys Gly His 5
【0053】配列番号: 4 配列の長さ: 4 配列の型: アミノ酸 トポロジー: 直鎖状 配列の種類: ペプチド 配列 Gys Gly His Cys	【0056】配列番号: 7 配列の長さ: 29 配列の型: 核酸 トポロジー: 直鎖状 配列の種類:
【0054】配列番号: 5 配列 CCGGAATTCC CWTGGTGYGG WCAYTGyAA	29
【0057】配列番号: 8 配列の長さ: 28 配列の型: アミノ酸 配列 CGCGGATCCT GWCERCACCA WGGDCGRT	28
【0058】配列番号: 9 配列の長さ: 4 配列の型: アミノ酸 トポロジー: 直鎖状 配列の種類: ペプチド 配列 ATAAGAATGC GGCOCACAAA TGAAGTTAAC TAATTCAAA	Arg Asp Glu Leu 【0059】配列番号: 10 配列の長さ: 40 配列の型: 核酸 トポロジー: 直鎖状 配列の種類: 化学合成DNA 40
【0060】配列番号: 11 配列の長さ: 38 配列の型: 核酸 配列 ATAGAATGC GGCOCCTTAT AATTATCAC GAACATCA	トポロジー: 直鎖状 配列の種類: 化学合成DNA 38
【図面の簡単な説明】 【図1】図1はキャンディダ・ボイディニのPDI 1遺伝子を含む6.2 kbのDNA断片の制限酵素地図、塩基配列を決定した部分、およびPDI 1遺伝子の位置と方向を示す図である。	【図2】図2はC. boidinii におけるPDI 遺伝子の存在を示すサザンハイブリダイゼーションの結果を示す図である。 【図3】図3(a)はARP 遺伝子の発現ベクター-pARP3、および(b)はPDI遺伝子の発現ベクター-pARP1の構成を

示す図である。

【図4】図4はPD1遺伝子の発現ベクターpNRPDの作成の手順を示す図である。

【図5】図5はBPO17株のゲノムDNAにARP遺伝子が組み込まれた状態を示す模式図、およびそれを確認したサザンハイブリダイゼーションの結果を示す図である。

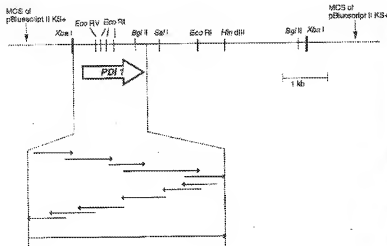
【図6】図6はBPP1株のゲノムDNAにPD1遺伝子が組み

込まれた状態を示す模式図、およびそれを確認したサザンハイブリダイゼーションの結果を示す図である。

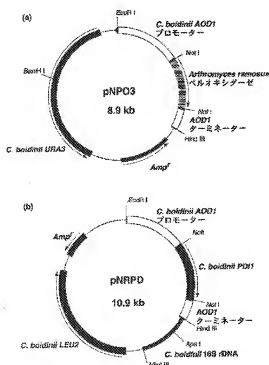
【図7】図7はPD1遺伝子の発現量を解析したノーザン分析の結果を示す図である。

【図8】図8はBPO17株、BPP1株、BUL株を培養したときの培養液中のAMP活性を示す図である。

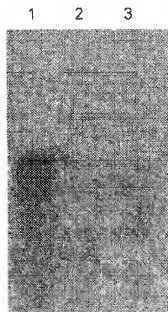
【図1】



【図3】



【図7】

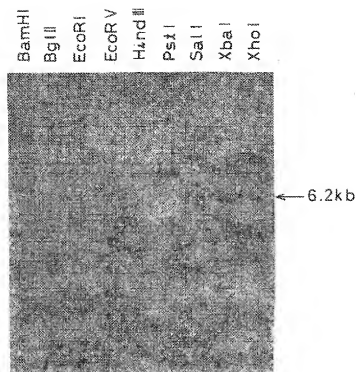


PD1

- 1 : BPP1株
- 2 : BPO17株
- 3 : BUL株

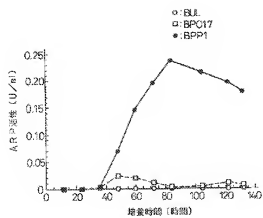
図面代用写真

【図2】

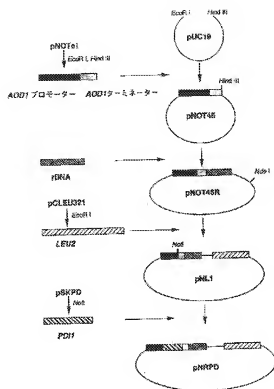


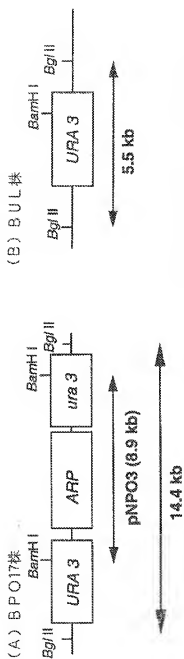
図面代用写真

【図8】

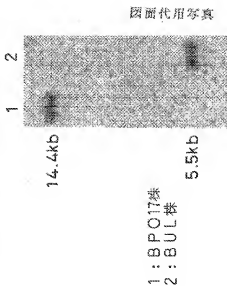


【図4】



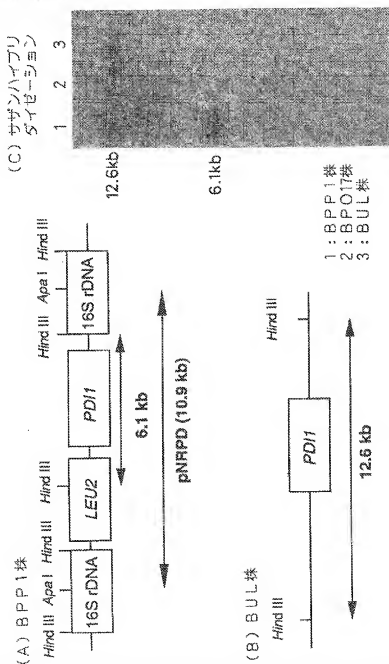


(C) サザンハイブリダイゼーション



【図6】

図面代用写真



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶

C 1 2 R 1:72)

(C 1 2 N 1/19

C 1 2 R 1:72)

識別記号

F I

(C12N 9/00
C12R 1:72)